

〔序〕

悪性黒色腫は最も予後の悪い皮膚腫瘍の一つである。その生物学的特徴として自律増殖能があげられ、MAPK の常時活性化が関与していることが明らかにされている。この活性化機序としては従来より *NRAS* 変異が一部の黒色腫において見つかったが、近年 *BRAF* 変異が半数以上の黒色腫において見いだされ、結果 MAPK の活性が上昇する事が明らかにされた。しかしながら、最近では *BRAF* 変異と MAPK 活性化が相関しないとの報告があり、さらに *KIT* 変異が悪性黒色腫の MAPK 活性化ならびに AKT の活性化に関与しているとの報告もある。日本人における悪性黒色腫においてこれらの点を明らかにすべく遺伝子異常と増殖シグナル活性化状態について *in vivo* で検討し、病型、臨床像との相関の有無について解析した。

〔対象および方法〕

悪性黒色腫患者 37 名（末端黒子型、以下 ALM : 20 例、表在拡大型、以下 SSM : 17 例）のパラフィン切片からレーザーマイクロダイセクションにより腫瘍細胞のみを切り出し、抽出した DNA を用いて *BRAF* exon 15, *NRAS* exon 2, *KIT* exon 9, 11, 13, 17, 18 のダイレクトシーケンス、*BRAF* exon 15 のパイロシーケンスを行った。また抗 c-KIT 抗体、抗 pERK 抗体（活性化されたリン酸化 MAPK を認識）、抗 pAKT 抗体を用いた免疫染色を行い、染色強度を定量化した上で病型、臨床像との相関の有無につき統計学的解析を行った。

〔結果〕

BRAF の変異は 25 例（ALM の 65%、SSM の 70.6%）、*KIT* 変異は 9 例（ALM の 15%、SSM の 11.7%）にあり、*NRAS* の変異はなかった。*BRAF* のダイレクトシーケンスとパイロシーケンスの結果は一致しており、変異率は既報告（ALM : 0%~33%、SSM : 49%~64.3%）より高かった。*KIT* の変異は、比較的稀とされる exon9 に最も多くみられた。変異 *KIT* をもつ 9 例中 7 例は *BRAF* 変異を有していた。c-KIT の発現は ALM の水平増殖病変では増強していたが、ALM の垂直増殖病変ならびに SSM では発現が低下していた。pERK および pAKT の発現は黒色腫組織内において均一ではなく、腫瘍の一部（25%以下）で陽性所見がみられた。*BRAF* 変異により ERK、AKT のリン酸化の軽度増強が、また *KIT* の変異により AKT のリン酸化の軽度増強がみられたものの、これらは統計学的に有意ではなかった。また *BRAF* 変異により生命予後の悪化傾向がみられたものの、統計学的に有意差はなかった（ $p=0.66$ ）。

〔考察〕

今回我々の解析において *BRAF* 変異率が既報告よりも高かったが、ごく最近悪性黒色腫の腫瘍は *BRAF* の変異を持つ細胞と持たない細胞が混在するヘテロな細胞の集団であることが指摘されており、今回の我々の検討はレーザーマイクロダイセクションで腫瘍の一部を切り出して解析しており、そのために変異細胞の検出感度が高かった可能性が考えられる。これまで比較的稀とされていた *KIT* exon 9 の変異頻度が高かった。欧米人を中心にこれま

での調査がなされてきた民族的差異と、稀とされていたため調査される頻度自体が少なかったという2つの要因を考えた。尚、MAPK 活性化にかかわる *KIT* exon13 の変異症例はなく、17 の変異は *silence* 変異のみであった。今回 *KIT* の DNA 増幅についての検討はおこなわなかったが、c-*KIT* 抗体染色による *KIT* 蛋白の発現は ALM の水平増殖病変では高く、垂直増殖病変部では低下、また SSM でも低下しており、我々の既報告の結果と合致していた。*KIT* は変異よりも増幅がその発現ならびに下流のシグナル活性化に関わっている事が推察された。

BRAF 変異により ERK、AKT のリン酸化の軽度増強、ならびに生命予後の悪化傾向がみられたものの、統計学的に有意差はなかった。今回我々が検討した p.V600E 変異をもつ *BRAF* 蛋白を標的とした分子標的治療薬による黒色腫の治療が行われているが、一旦黒色腫細胞が減少するものの6カ月以内に再発し、MAPK が再活性化している事が示されている。p.V600E 変異をもつ培養黒色腫細胞ならびに良性の母斑細胞を樹立し、Western blotting で pERK の発現を検討したところ、黒色腫細胞では ERK のリン酸化が生じているが、母斑細胞では ERK のリン酸化は非常に弱い状態である事を我々は見いだしている。すなわち色素細胞の増殖制御における MAPK の活性化には変異 *BRAF* のみでは不十分で、他のリン酸化脱リン酸化制御が働いている事が示唆される。今回の我々の *in vivo* の解析結果もこれらを支持するものであった。今後この制御機構を明らかにする事ができれば、新たな黒色腫への分子標的治療薬の開発につながる事が期待できる。